

IZABEL DE SOUZA CHAVES

**CONTRIBUIÇÃO DA BARREIRA TEGUMENTAR PARA A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Stylosanthes humilis* H.B.K.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

IZABEL DE SOUZA CHAVES

**CONTRIBUIÇÃO DA BARREIRA TEGUMENTAR PARA A
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Stylosanthes humilis* H.B.K.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

Aprovada: 19 de julho de 2011

Prof. Fernando Luíz Finger
(Coorientador)

Prof. Anderson Adriano Martins Melo

Prof. Raimundo Santos Barros
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho e incentivo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e à Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou os meios para a realização do Curso de Mestrado.

Ao Prof. Raimundo Barros, pelos ensinamentos, compreensão, amizade e paciência.

Aos colegas de laboratório, que participaram efetivamente deste trabalho, pela ajuda e amizade.

Aos demais professores do curso, funcionários e colegas que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

CONTEUDO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 Material vegetal.....	6
3.2 Condução dos experimentos.....	6
3.3 Quebra da dormência com reguladores	7
3.4 Quebra da dormência por imersão em água	8
3.5 Germinação de sementes intactas.....	8
3.6 Escarificação ácida.....	9
3.7 Escarificação após a imersão na solução dos reguladores.....	10
3.8 Análises anatômicas	11
3.9 Delineamento experimental.....	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 Quebra da dormência com reguladores	13
4.2 Quebra da dormência por imersão em água	16
4.3 Germinação de sementes intactas tratadas com reguladores.....	18
4.4 Escarificação ácida.....	25
4.5 Escarificação mecânica após imersão nos reguladores	35
5 CONCLUSÕES.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

CHAVES, Izabel de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Contribuição da barreira tegumentar para a germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Orientador: Raimundo Santos Barros. Coorientadores: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias e Fernando Luíz Finger

Sementes de estilosante (*Stylosanthes humilis* HBK), leguminosa tropical, forrageira anual, exibem uma barreira tegumentar imposta principalmente pelos macroesclereídios que compõe o tecido paliádico do tegumento. Alguns reguladores de crescimento são capazes de penetrar o tegumento das sementes, estimular a germinação e promover o crescimento do embrião que, então rompe a barreira tegumentar. Quando as sementes são escarificadas em seguida ao tratamento das sementes com reguladores por 48 ou 72 h, ocorre quebra parcial da dormência, mostrando que os reguladores haviam penetrado pelo tegumento. Os reguladores de crescimento que exibiram maior permeância, i. e., aqueles que propiciaram um nível de germinação mais alto foram: ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano, tiouréia e ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) + benziladenina (BA). CEPA e BA, isoladamente, também puderam quebrar a dormência, dependendo do lote de sementes estudado. Tratamentos de escarificação mecânica (com o uso de lixa d'água) e química (com H₂SO₄) tornaram o tegumento permeável à água e solução dos reguladores de crescimento por afetarem a cutícula e os macroesclereídios do tegumento e, por isso, são rotineiramente empregados na quebra da paradormência tegumentar das sementes.

ABSTRACT

CHAVES, Izabel de Souza, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa. July, 2011. **Contribution of seed coat to the control of germination of *Stylosanthes humilis* H.B.K. seeds.** Adviser: Raimundo Santos Barros. Co-advisers: Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias and Fernando Luíz Finger

Seeds of Towsville stylo (*Stylosanthes humilis* HBK), a tropical annual forage legume, exhibit a seed coat barrier to water and solutions imposed mainly by its macrosclereids, elongated palisade cells. Some growth regulator solutions are capable to penetrate the seed coat stimulating embryo growth, which causes then coat rupture, leading to germination. When seeds are scarified mechanically with sandpaper following treatments with regulators for 48 or 72 h, dormancy is partially broken, showing that regulators had penetrated through the seed coat. The growth regulators which mostly permeate seed coat thus promoting germination were: 1-amino-1-cyclopropane-1-carboxylic acid, thiourea and the combination 2-chloroethylphosphonic acid (CEPA) plus benzyladenine (BA). CEPA and BA, isolatedly, were also able to break dormancy, depending on the seed lot studied. Seed coat became highly permeable to water and growth regulators after mechanical (with sandpaper) and chemical (with sulfuric acid) scarification.

1 INTRODUÇÃO

Stylosanthes humilis H.B.K. (estilosante) é uma espécie tropical forrageira, anual, que produz grande quantidade de sementes. Pertence à família Fabaceae, subfamília *Papilionoideae*, sendo o gênero constituído de cerca de 40 espécies, distribuídas em áreas tropicais da América, África e sudeste da Ásia (Cook et al 2005). O Brasil é tido como o maior centro de origem e diversidade de *Stylosanthes* (Lewis et al 2005) e algumas espécies são consideradas a principal fonte de leguminosas forrageiras em ambientes tropicais e subtropicais (Edye e Cameron 1984), devido especialmente ao seu alto teor de proteínas e bom desenvolvimento em solos relativamente pobres (Santos et al 2009). Em geral, as leguminosas forrageiras apresentam alta qualidade nutritiva em comparação com as gramíneas forrageiras (Klusmann 1988) e contribuem para o incremento de nitrogênio no solo, por meio da fixação simbiótica. Sementes de algumas espécies dessa família possuem tegumento relativamente rijo, o que impede a germinação (Cameron 1967, Bewley e Black 1994).

A dormência, de modo geral, pode ser entendida como a suspensão temporária do crescimento visível de alguma estrutura da planta que contenha um meristema (Lang et al 1987). Diversos fatores podem causar dormência, mas, nos casos em que um fator físico ou sinal bioquímico originário de uma estrutura diferente da estrutura afetada está envolvido, a dormência é classificada como paradormência. A paradormência pode ser desencadeada ambientalmente ou ser originária de fatores morfogênicos produzidos em órgãos adjacentes como a testa, o pericarpo ou órgãos extraflorais (Lang et al 1987). No caso de sementes, nem sempre um sinal bioquímico está envolvido e a paradormência é devida aos tecidos que recobrem o embrião (Arteca 1996) que, geralmente, atuam como: a) barreiras de permeabilidade, impedindo a absorção de água ou as trocas gasosas; b) barreiras mecânicas que previnem a expansão do embrião; ou c) acúmulo de

inibidores da germinação. Além disso, os tecidos que recobrem o embrião podem impedir a lixiviação de inibidores da germinação dos tecidos do embrião durante o processo de embebição e, indiretamente, prolongar a dormência (Adkins et al 2002).

No caso de estilósante, a germinação é regulada por dois mecanismos, um de natureza tegumentar (paradormência) e outro de natureza embrionária, a endodormência (Cameron 1967), estratégias que garantem a sobrevivência da espécie, impedindo a germinação quando as condições de crescimento da plântula são desfavoráveis (Argel e Humpreys 1983 a). A endodormência é regulada por fatores fisiológicos dentro da própria estrutura afetada e, no caso de sementes, se o embrião é excisado, ele não consegue germinar tão rapidamente quanto os não-dormentes ou não produz plântulas normais (Lang et al 1987). A endodormência de estilósante reduz-se gradualmente com a idade pós-colheita da semente, não mais ocorrendo entre 12 e 15 meses (Vieira e Barros 1994). Já a sua paradormência tegumentar não é perdida naturalmente com o armazenamento normal das sementes (Cook et al 2005).

Alguns processos que ocorrem naturalmente podem provocar a escarificação do tegumento como, por exemplo, ações abrasivas do solo e da água, secagem, congelamento e descongelamento, passagem pelo trato digestivo de animais, ataque de microorganismos (Vazquez-Yanes e Orozco-Segovia 1993; Baskin e Baskin 1998). Além disso, de acordo com Tran e Cavanagh (1984), a barreira tegumentar também pode ser rompida por tratamentos de escarificação mecânica (e. g., uso de lixas, areias, impacto ou pressão), química (e. g., ácidos, alcoóis, acetona, agentes oxidantes) ou térmica (e. g., calor, água fervente, ondas eletromagnéticas).

Os efeitos dos processos de escarificação no tegumento das sementes são variáveis entre as espécies, mas nas leguminosas, de acordo com Zeng et al (2005),

existem duas linhas de pensamento acerca do efeito dos tratamentos. A primeira delas é a de que os processos de escarificação atuam em regiões específicas no tegumento da semente, como por exemplo, o hilo, a micrópila, o estrofíolo e a lente (regiões fisicamente mais frágeis do tegumento). Essas regiões sofreriam alterações morfológicas durante a perda da dormência (seja de forma natural ou não), que permitiriam a entrada de água. Já a segunda corrente sugere que todo o tegumento está envolvido na entrada de água, não havendo uma região específica para tal. Porém, independentemente do local em que ocorra a alteração morfológica, desde que ocorra enfraquecimento ou dano no tegumento das sementes e que possibilite a entrada da água, poderá ocorrer, conseqüentemente, a iniciação do processo de germinação (Tran e Cavanagh 1984).

A germinação ocorre desde que as sementes não apresentem também algum grau de endodormência ou uma ecodormência (esta devida a um ou mais fatores não-permissivos do ambiente; em sementes equivaleria à quiescência) (Lang et al 1987). Em estilozante, sabe-se que diversos compostos são capazes de quebrar a endodormência de sementes escarificadas, tais como o ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA, Ethrel), benziladenina (BA), tiouréia (TU), compostos selênicos (Burin et al 1987, Pinheiro et al 2008), íons tóxicos (Delatorre e Barros, 1996). De maneira semelhante, sabe-se que soluções aquosas de baixos pHs também promovem a germinação (Footitt e Cohn 1992, Pelacani et al 2005). Obviamente, para que essas substâncias sejam eficazes na quebra da dormência, é necessário que elas tenham uma boa penetração nas camadas de células dos tecidos das sementes e alcancem o embrião, nem que para tal seja necessário algum processo de escarificação.

A estrutura celular do tegumento de sementes de *S. scabra* e de *S. hamata* é bastante similar, porém Argel e Humphreys (1983 c) consideram que *S. hamata* possui

uma camada de tecido a mais, a cutícula, o que não foi verificado por Serrato-Valenti et al (1993) em *S. scabra*. As demais camadas de tecidos do tegumento (três) são encontradas em ambas as espécies. A camada mais externa em *S. scabra* ou a camada subsequente à cutícula em *S. hamata*, é composta de tecido paliçádico e pode ser dividida em duas secções: (i) uma parte sulcada, situada na região exterior do tegumento e que se estende internamente por cerca de um terço ou um quarto do tecido paliçádico. Nela, as células possuem a extremidade em formato poligonal com sulcos bastante evidentes e espessamento longitudinal da parede; (ii) um setor cilíndrico, que se estende por toda a parte remanescente de tecido paliçádico (3/4 ou 2/3), em que os espessamentos são menos evidentes e o lúmen maior e a porção inferior é bastante irregular, algumas vezes encurvada.

A camada de células interiormente subsequente é chamada de hipoderme e é constituída de osteoesclereídios (células em formato de ampulheta) com grandes espaços intercelulares. A camada mais interna do tegumento é composta de tecido parenquimático, porém em *S. scabra*, Serrato-Valenti et al (1993) consideram que essa camada de tecido parenquimático está dentro da hipoderme, sendo o parênquima colapsado com alguns feixes vasculares nele embebidos. As camadas de células paliçádicas conferem grande parte da impermeabilidade do tegumento, mas além delas, a superfície de sementes é, geralmente, coberta por uma mistura complexa de lipídios, de caráter hidrofóbico e polimérico, tais como suberina, cutina, ceras e por outras substâncias como calose, fenóis, sílica e pectina que atuam como uma barreira, restringindo a entrada de substâncias no tegumento (Zeng et al 2005).

Diante do exposto, percebe-se que a restrição imposta pelo tegumento das sementes de leguminosas é um fator relevante na germinação. Uma vez que os compostos capazes de quebrar a endodormência das sementes consigam penetrar no

tegumento e atingir o embrião (vencer a barreira física imposta à entrada de água e gases), e sendo o embrião capaz de vencer a barreira tegumentar (imposta à sua expansão), as sementes poderão germinar (Bewley e Black 1994). Dessa forma, a barreira tegumentar possui uma função restritiva à germinação tão importante quanto a endodormência. E a quebra da paradormência tegumentar é um processo irreversível, ou seja, uma vez que o tegumento se torna permeável, ele não mais pode tornar-se impermeável, diferentemente da endodormência, em que algumas sementes podem entrar em dormência secundária, após a primária ter sido quebrada (Hamley 1932).

A barreira tegumentar assume um papel modulador frente às interações entre as estruturas internas da semente, o meio ambiente e a germinação (De Souza e Marcos-Filho 2001). Porém, apesar de a paradormência tegumentar de espécies leguminosas ser um fator controlador da germinação, poucos estudos estão voltados para as interrelações entre a expansão embrionária e a resistência da barreira tegumentar, em especial no gênero *Stylosanthes*. Além disso, trabalhos relacionados à imposição natural do tegumento em sementes com e sem endodormência são escassos.

2 OBJETIVOS

Avaliar a contribuição da barreira tegumentar na germinação de sementes de estilósante, em resposta a expansão do embrião promovida por reguladores de crescimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Plantas de estilozante foram cultivadas em casa-de-vegetação na Universidade Federal de Viçosa (20° 45' S, 42° 15' W), Viçosa, Minas Gerais, em vasos plásticos de 3,5 dm³. O substrato foi composto de solo latossolo vermelho-amarelo e esterco bovino curtido, na proporção de 2:1, recebendo adubação de cobertura NPK (4-14-8), por duas vezes. A irrigação foi realizada diariamente, mantendo-se a umidade do substrato próxima à capacidade de campo. Por ser uma espécie de dia curto (Cameron e 't Mannetje 1977), as plantas foram cobertas com uma empanada preta no período de janeiro a março, de modo a reduzir-se o fotoperíodo para 8 h diárias, para a indução da floração. Os frutos, quando maduros, foram coletados periodicamente e armazenados em sacos de papel, no laboratório, até a condução dos experimentos. Dessa forma, havia disponibilidade de sementes de diferentes idades pós-colheita e, conseqüentemente, diferentes graus de endodormência, por todo o período experimental.

3.2 Condução dos experimentos

Para a realização dos ensaios, os frutos foram debulhados por fricção entre duas superfícies emborrachadas. Em seguida, as sementes foram semi-esterelizadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, por 10 min e, posteriormente, lavadas exaustivamente com água destilada. Todas as soluções-teste foram preparadas em tampão tris-HCl 10⁻² mol dm⁻³, sob pH 7,0 (controle), com algumas gotas de Tween 80 (0,05%). Todos os reguladores utilizados foram procedentes da SIGMA (Missouri, EUA).

Para os ensaios de germinação, as sementes foram infiltradas com as soluções-teste (10 cm^3), com duas aplicações de vácuo por um período de 3 min e um intervalo de 3 min entre as aplicações. Posteriormente, foram colocadas para germinar em placas de Petri de vidro (90 mm de diâmetro), semi-esterilizadas a $105\text{ }^\circ\text{C}$, por 4 h, contendo ao fundo, duas camadas de papel de filtro Whatman n° 1. Os testes de germinação foram conduzidos em câmara de crescimento noite/dia (tipo BOD, Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), a $30\text{ }^\circ\text{C}$, no escuro (exceto para o experimento de imersão das sementes, em que a temperatura utilizada foi $25\text{ }^\circ\text{C}$). A germinação foi registrada diariamente, durante cinco dias, sendo a protrusão da radícula, o critério adotado para considerar-se uma semente germinada.

3.3 Quebra da dormência com reguladores

Dois diferentes lotes de sementes foram utilizados neste experimento para verificar quais reguladores de crescimento foram capazes de quebrar a dormência das sementes. Em ambos, foram utilizadas sementes dormentes e escarificadas mecanicamente entre duas lixas d'água n° 180 e colocadas para germinar em placa de Petri contendo ao fundo, duas camadas de papel Whatman n° 1 e 10 cm^3 das soluções dos reguladores, em câmara de crescimento, a $30\text{ }^\circ\text{C}$.

Um dos lotes foi tratado com os seguintes reguladores de crescimento: ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) 10^{-5} e $10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$, benziladenina (BA) 10^{-5} e $10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$, CEPA + BA 10^{-5} e $10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$ e tiouréia (TU) 10^{-2} e $10^{-1}\text{ mol dm}^{-3}$. Já o outro lote de sementes foi tratado com CEPA, diferentes citocininas e com a combinação de CEPA + citocininas, todos às concentrações entre 10^{-7} a $10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$. Posteriormente, os valores de percentagem de germinação das sementes tratadas com CEPA e citocininas

isoladamente foram somados e comparados com o valor da germinação sob a combinação CEPA + citocininas, para saber se houve um efeito sinérgico. As citocininas utilizadas foram: BA, cinetina (CINET), dihidrozeatina (DZ), dimetilalilaminopurina (2IP) e zeatina (ZEA); seus respectivos ribosídeos e as substâncias citocininóides, à base de uréia, cloropiridilfeniluréia (CPPU), difeniluréia (DU) e thidiazuron (TDZ). Para a dissolução dos compostos citocininóides foram utilizadas algumas gotas de Tween 80 (0,05%), seguido de aquecimento da mistura, e para as demais citocininas e ribosídeos, foram utilizadas algumas gotas de dimetilsulfóxido (DMSO).

3.4 Quebra da dormência por imersão em água

Sementes dormentes e não-dormentes, não escarificadas e escarificadas mecanicamente com lixa d'água nº 180, foram imersas em 100 cm³ de água destilada, com algumas gotas de Tween 80 (0,05%), em copo de vidro de 150 cm³, pH 7,0 por 3, 6, 9, 12, 18 e 24 h e mantidas em câmara de crescimento a 25 °C. Decorrido o tempo de imersão, foi avaliada a germinação ocorrida dentro do copo e as sementes que não germinaram foram transferidas para placa de Petri contendo tris-HCl 10⁻² mol dm⁻³, pH 7,0, sendo a germinação total avaliada por mais quatro dias. Como controle, foram utilizadas sementes em placa de Petri, sem passar por nenhum período de imersão.

3.5 Germinação de sementes intactas

Para determinar-se o grau de permeabilidade das sementes aos reguladores de crescimento, sementes dormentes e não-dormentes, sem qualquer tratamento de

escarificação, foram imersas em soluções de diferentes reguladores de crescimento, a saber: CEPA 2×10^{-5} e 2×10^{-4} mol dm⁻³, BA 2×10^{-5} e 2×10^{-4} mol dm⁻³, CEPA + BA 2×10^{-5} e 2×10^{-4} mol dm⁻³, TU 2×10^{-2} e 2×10^{-1} mol dm⁻³, ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) 2×10^{-4} e 2×10^{-3} mol dm⁻³, além de condições promotoras da germinação, como pHs 2,0 e pH 3,0 (no caso, as soluções eram renovadas após 12 h). Como controle, foram utilizadas sementes intactas, sementes em pH 7,0 (renovado após 12 h). Foram utilizadas sementes coletadas em quatro diferentes ocasiões, 2006 e 2011 para sementes dormentes e 2005 e 2010 para sementes não-dormentes. A montagem do experimento foi realizada em placas de Petri semi-esterilizadas, com as sementes, e colocadas para germinar em câmara de crescimento a, 30 °C.

Adicionalmente, estimou-se também o grau de umidade das sementes coletadas em julho de 2010 (não-dormentes, com $82,1 \pm 1,5\%$ de germinação, quando escarificadas mecanicamente) e em março de 2011 (dormentes, com $0,8 \pm 0,4\%$ de germinação, quando escarificadas mecanicamente). Foi determinada a massa fresca das sementes e a massa seca após as sementes permanecerem em estufa a 105 °C, por três dias, conforme descrito por Brasil (2009). Estimou-se o teor de umidade com base no peso úmido, pela fórmula:

$$\% \text{ de Umidade} = \frac{100 (P_i - P_f)}{P_i - t}$$

em que: P_i = massa inicial, massa do recipiente mais a massa da semente, P_f = massa final, massa do recipiente mais o massa da semente seca, t = tara, massa do recipiente.

3.6 Escarificação ácida

Para testar-se a eficiência da escarificação ácida na quebra da dormência das sementes, sementes dormentes e não-dormentes foram imersas em ácido sulfúrico

(H₂SO₄) concentrado por 15; 30 e 45 s e 1; 2,5; 5; 10; e 15 min, e sementes não-dormentes em ácido clorídrico (HCl) concentrado por 1; 2,5; 5; 10; 15; e 30 min. Em seguida, as sementes foram lavadas exaustivamente com água destilada, secas sobre papel absorvente em bancada por 24 h e colocadas para germinar em tris-HCl 10⁻² mol dm⁻³ pH 7,0, em placas de Petri semi-esterilizadas, em câmara de crescimento, a 30 °C.

A permeabilidade do tegumento escarificado com H₂SO₄ foi avaliada tratando-se as sementes com diferentes reguladores de crescimento após as sementes dormentes e não-dormentes terem sido imersas em H₂SO₄ por 45 s; 1; 2,5; e 5 min. Os reguladores fornecidos às sementes escarificadas foram: CEPA 10⁻⁵ e 10⁻⁴ mol dm⁻³, BA 10⁻⁵ e 10⁻⁴ mol dm⁻³, CEPA + BA 10⁻⁵ e 10⁻⁴ mol dm⁻³ e TU 10⁻² e 10⁻¹ mol dm⁻³. Como controle, em todos esses experimentos, foram utilizadas sementes não-escarificadas e sementes escarificadas mecanicamente com lixa e levadas a germinar em tris-HCl 10⁻² mol dm⁻³, pH 7,0.

3.7 Escarificação após a imersão nos reguladores

Sementes dormentes e não-dormentes foram imersas em diferentes reguladores de crescimento e inibidores da germinação, em béquer de 50 cm³ e em placa de Petri de 150 mm de diâmetro (maior disponibilidade de oxigênio), ambos com 20 cm³ de regulador. As sementes foram imersas por 24, 48 e 72 h em câmara de crescimento durante o tempo de imersão, a 30 °C. Decorrido o tempo de imersão, as sementes, dormentes e não dormentes foram secas sobre bancada, por 24 h, em papel absorvente, escarificadas mecanicamente por leve fricção entre lixas d'água n° 180 e colocadas para germinar em tris-HCl 10⁻² mol dm⁻³.

Com as sementes dormentes, os reguladores utilizados foram: CEPA 10^{-4} mol dm^{-3} , BA 10^{-4} mol dm^{-3} , ácido giberélico (GA_3) 10^{-4} mol dm^{-3} , CEPA + BA 10^{-4} mol dm^{-3} , CEPA + GA_3 10^{-4} mol dm^{-3} , BA + GA_3 10^{-4} mol dm^{-3} , CEPA + BA + GA_3 10^{-4} mol dm^{-3} , TU 10^{-2} e 10^{-1} mol dm^{-3} e ACC 10^{-4} mol dm^{-3} .

Já as sementes não-dormentes foram imersas em inibidores da germinação de sementes de estilósante: ácido abscísico (ABA) 10^{-4} mol dm^{-3} e em inibidores da biosíntese do etileno: ácido aminooxiacético (AOA) 10^{-3} mol dm^{-3} , aminoetoxivinilglicina (AVG) 10^{-4} mol dm^{-3} , Co^{2+} 10^{-3} mol dm^{-3} , e a combinação AVG + Co^{2+} (10^{-4} e 10^{-3} mol dm^{-3} , respectivamente). Como controle, em todos os experimentos, foram utilizadas sementes intactas e sementes escarificadas com lixa d'água nº 180, colocadas diretamente em placa de Petri, sem imersão em solução, e sementes imersas em tris-HCl 10^{-2} mol dm^{-3} com e sem escarificação posterior.

3.8 Análises anatômicas

Sementes dormentes e não-dormentes foram fixadas e preparadas para análise anatômica por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com o protocolo descrito por Alves (2004). Para a observação das estruturas internas, os diásporos foram congelados em nitrogênio líquido, seccionados e preparados de acordo com o aquele protocolo. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP, Cambridge, Reino Unido.

Análises anatômicas por microscopia de luz também foram realizadas. Para tal, foram efetuados cortes de 60 μm de espessura nas sementes dormentes e não-dormentes, com o auxílio de um criomicrotomo LEICA CM 1850, Nussloch, Alemanha, sendo os cortes fixados em álcool a 70% até a confecção das lâminas. Sementes

intactas, escurificadas com lixa e imersas em H₂SO₄ concentrado por 1 e 5 min foram coradas com Safrablau, de acordo com o protocolo descrito por Bukatsch (1972).

Testes histoquímicos foram realizados no tegumento de sementes dormentes e não-dormentes para verificar a presença de ligninas (pela utilização do corante floroglucina ácida), lipídeos (utilizando Sudam III) e compostos fenólicos (com cloreto de ferro III), de acordo com protocolos descritos por Johansen (1940). A ocorrência de compostos fenólicos também foi analisada por estudos de microscopia de fluorescência, utilizando-se de cloreto de alumínio, conforme descrito por Charrière-Ladreix (1976).

Para cada tratamento, foram confeccionadas duas lâminas contendo pelo menos quinze cortes cada uma delas. As observações e a captura de imagens foram realizadas utilizando-se de microscópio de luz (modelo Olympus AX70TF, Olympus Optical, Tokyo, Japão), com sistema U-Photo, com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc. New York, USA).

3.9 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos de germinação foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de germinação foi composta por 50 sementes, com cinco repetições por tratamento. As porcentagens de germinação foram transformadas em arco-seno $(\% G/100)^{1/2}$, para seguirem distribuição normal e foram submetidas aos tratamentos estatísticos. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scott e Knott (1974), em nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quebra da dormência com reguladores

Para avaliar-se o papel de diferentes reguladores de crescimento na quebra das sementes dormentes de estilosante, essas foram imersas em soluções de diferentes reguladores, sob duas concentrações diferentes. As sementes tiveram sua dormência quebrada quando tratadas com os reguladores de crescimento CEPA, BA e TU. Em alguns lotes de sementes, a aplicação de CEPA 10^{-4} mol dm^{-3} foi suficiente para quebrar totalmente a dormência das sementes acima de 90% (Tabela 1), resposta usualmente encontrada (Vieira e Barros 1994). Ocasionalmente, em outros lotes, além da aplicação do CEPA, uma citocinina (no caso BA) foi necessária para complementar a ação do etileno (Figura 1), caso raramente observado (ver Burin et al 1987). A TU (10^{-1} mol dm^{-3}) quebrou a dormência das sementes de maneira similar, independentemente do lote utilizado.

Tabela 1 – Germinação de sementes dormentes escarificadas de estilosante, com cinco dias de idade pós-colheita, submetidas a tratamento com diferentes reguladores de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Tratamento, mol dm^{-3}	Germinação, %
Controle	11,6 ± 1,5 c
TU 10^{-2}	14,0 ± 3,0 c
TU 10^{-1}	87,5 ± 1,9 a
CEPA 10^{-5}	73,6 ± 2,6 b
CEPA 10^{-4}	94,8 ± 2,2 a
BA 10^{-5}	33,6 ± 3,1 b
BA 10^{-4}	51,2 ± 4,5 a
CEPA + BA 10^{-5}	85,6 ± 2,7 a
CEPA + BA 10^{-4}	95,6 ± 1,7 a

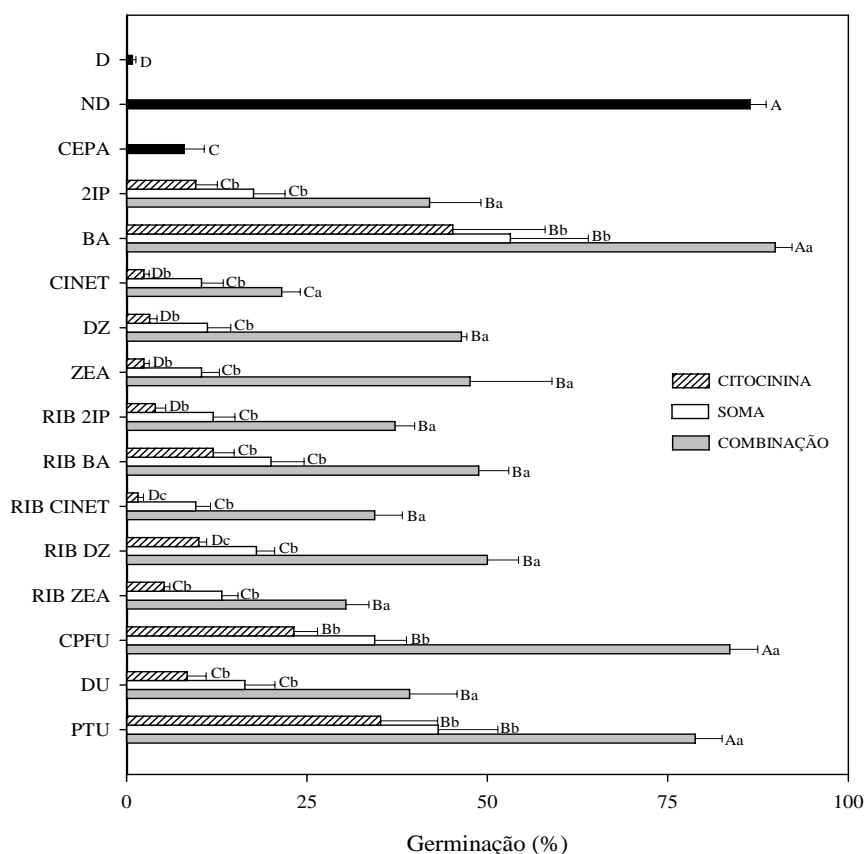


Figura 1 – Germinação de sementes de estilósante, com 115 dias de idade pós-colheita, tratadas com CEPA, diferentes citocininas e a combinação dos dois grupos de fitorreguladores, à concentração de 10^{-6} mol dm^{-3} . Letras maiúsculas comparam todos os tratamentos e minúsculas cada grupo de citocininas (citocinina e CEPA (individualmente), a soma de citocininas e CEPA e a combinação de citocinina e CEPA), pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade. D – sementes dormentes, ND – não dormentes, CEPA – ácido 2-cloroetilfosfônico, 2IP – dimetilalilaminopurina, BA – benziladenina, CINET – Cinetina, DZ – dihidrozeatina, ZEA – zeatina, RIB – ribosídeo, CPFU – cloropiridilfeniluréia, DU – difeniluréia, PTU – thidiazuron

De acordo com Burin et al (1987), é possível que existam três lotes diferentes de sementes de estilósante. Em um deles, as sementes podem sintetizar ou ativar

citocininas suficientemente (maior parte das sementes), necessitando, portanto de etileno; em um segundo, as sementes possuem, podem sintetizar ou ativar etileno suficientemente, necessitando, portanto de uma citocinina; no terceiro lote, as sementes não produzem nenhum dos dois fitorreguladores suficientemente, necessitando dos dois princípios. Não foi observada nenhuma diferença fenotípica morfológica entre estes três grupos de sementes e, aparentemente, quando as sementes requerem o etileno e uma citocinina, por isso não se constitui resposta comum, o fato pode dever-se a uma segregação recessiva. Por isso, todos esses reguladores isoladamente e suas combinações foram utilizados na quebra da dormência das sementes.

No lote de sementes em que foram requeridos os dois fitorreguladores para que a dormência fosse quebrada, os compostos isolados quebram a dormência em um nível muito baixo, mas quando CEPA foi aplicado em combinações com as citocininas, o efeito mostrou-se sinérgico, i.e., maior do que a soma do efeito dos dois compostos isoladamente. Esse efeito sinérgico foi observado desde concentrações mais altas de 10^{-4} mol dm^{-3} até concentrações baixas, como 10^{-6} mol dm^{-3} . A concentração 10^{-7} mol dm^{-3} quebrou apenas parcialmente a dormência e não causou efeito sinérgico. Provavelmente, os reguladores estavam em um nível muito baixo (dados não mostrados).

Diversos trabalhos sobre germinação têm descrito um efeito sinérgico ou aditivo quando citocininas e etileno (ou CEPA) são utilizados conjuntamente. Khan e Huang (1988) conseguiram reverter o efeito do estresse salino em sementes de alface, com a utilização desses dois fitorreguladores. De maneira semelhante, Rao et al (1975) reverteram os efeitos da termoinibição e do ácido abscísico na germinação de sementes de alface. Além disso, Tao et al (1974) quebraram a dormência de sementes de *Xanthium pensylvanicum* Wallr. com a aplicação de cinetina e CEPA. Acredita-se que

as citocininas induzam a biossíntese de etileno por aumentarem os níveis de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (Logan e Stewart 1991; 1995) ou da oxidase do ACC (Babiker et al 1993). Nesse caso, para atuarem de maneira complementar, os dois reguladores estariam atuando em *pools* diferentes.

Sabe-se que tanto a capacidade de biossíntese quanto a sensibilidade das sementes de estilósante ao etileno são de fundamental importância em seu processo germinativo (Ribeiro e Barros 2004). Tanto as sementes dormentes quanto as não-dormentes são capazes de produzir etileno, porém o nível produzido pelas primeiras está muito abaixo do limiar necessário para a germinação (Pelacani et al 2005). Assim, para que as sementes dormentes e escarificadas germinem é necessário que alguma condição física ou química que estimule a produção de etileno seja aplicada às sementes.

4.2 Quebra da dormência por imersão em água

Sementes dormentes escarificadas imersas em água mostraram que 9 h após a sua imersão, a dormência foi parcialmente quebrada (as sementes germinavam no próprio copo), e após um período de 12 h de imersão, a percentagem de germinação das sementes chegou próximo a 70%, não mais diferindo entre os tempos de imersão de 18 e 24 h (Figura 2 A). Após o tempo de imersão, quando as sementes foram transferidas para as placas de Petri, a germinação continuou a ocorrer, indicando que o estímulo à quebra da dormência aconteceu durante o alagamento. Quando sementes não-dormentes escarificadas foram imersas em água, de maneira similar ao que ocorreu com as sementes dormentes, a germinação foi superior a 80%, sob tempos superiores a 12 h de imersão (Figura 2 B).

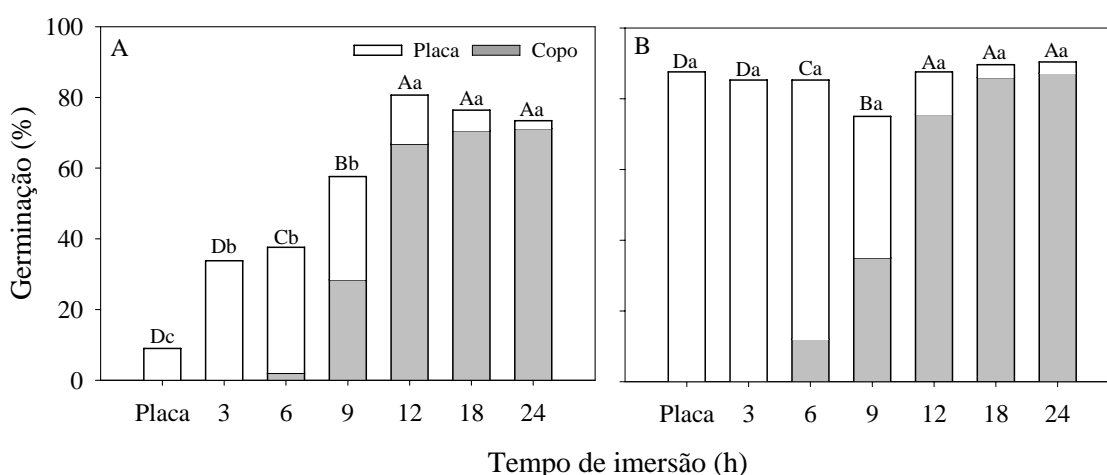


Figura 2 – Germinação de sementes escarificadas de estílosante submetidas a diferentes tempos de imersão no meio basal e depois transferidas para placa de Petri. A – Sementes dormentes, com 90 dias de idade pós-colheita. B – Sementes não-dormentes com 245 dias de idade pós-colheita. Letras maiúsculas comparam a germinação no copo e minúsculas a germinação total (copo e placa de Petri), em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Segundo Cook et al (2005), as sementes de estílosante podem sobreviver a curtos períodos de alagamento, mas não sobreviveriam a inundações prolongadas. A habilidade de germinar e crescer em condições de alagamento é uma adaptação de certas espécies a habitats e estações com condições favoráveis para a germinação, especialmente quando ocorre alagamento temporário do solo após uma chuva. A perda da dormência e germinação pode ocorrer porque, após o alagamento, o solo torna-se favorável ao crescimento das plântulas (Baskin e Baskin 1998). Além disso, o alagamento, além de diminuir os níveis de oxigênio, pode influenciar os níveis da sintase do ACC, estimulando a produção de etileno (Blom e Voesenek 1996).

Assim, pode ser que o alagamento temporário constitua um fino ajuste para a dispersão e sobrevivência das sementes de estílosante. Porém, independentemente da

estratégia de sobrevivência utilizada pelas sementes de estilósante, sabe-se que a barreira tegumentar exerce grande influência, uma vez que sementes não-escarificadas, independentemente de exibirem ou não endodormência, não germinam quando imersas em água por até 72 h, mesmo se escarificadas após a imersão (ver tratamentos-controle nas Tabelas 7 e 8, adiante). A barreira tegumentar impede a absorção de água pelas sementes, evitando que ocorra a germinação, conforme será discutido a seguir.

4.3 Germinação de sementes intactas tratadas com reguladores

De acordo com Cook et al (2005), 100% das sementes de estilósante possuem o tegumento rijo que não “amolece” durante o armazenamento normal. Esses dados estão de acordo com os presentes resultados de coleta nos anos de 2010 e 2011, já que não se observou germinação das sementes não-escarificadas, dormentes e não-dormentes no tratamento controle (tris-HCl 10^{-2} mol dm^{-3} pH 7,0) (Tabela 2), mas nas sementes coletadas em 2004 e 2005, houve germinação das sementes, embora em um valor baixo. Para que ocorresse uma expressiva germinação, foi necessária a aplicação de alguma substância que, estimulando a produção de etileno, fosse capaz de penetrar no tegumento das sementes.

Os maiores níveis de germinação encontrados nas sementes coletadas em 2005 e 2006 ocorreram quando as sementes estavam dormentes e foram tratadas com TU 2×10^{-1} mol dm^{-3} , BA + CEPA 2×10^{-4} mol dm^{-3} , BA + CEPA 2×10^{-5} mol dm^{-3} e CEPA 2×10^{-4} mol dm^{-3} . Nas sementes coletadas em 2010 e 2011, os maiores níveis de germinação ocorreram também nas sementes dormentes, porém quando tratadas com tris-HCl mol dm^{-3} em pH 2,0; CEPA 2×10^{-4} mol dm^{-3} ; ACC 2×10^{-3} mol dm^{-3} e ACC 2×10^{-4} mol dm^{-3} . Curiosamente, nesse exemplo, a germinação das sementes tratadas com TU 2×10^{-1} mol dm^{-3} não se mostrou elevada.

Tabela 2 – Germinação de sementes dormentes e não-dormentes, sem tratamento de escarificação (intactas), em quatro diferentes épocas de coleta. As sementes foram tratadas com diferentes reguladores e colocadas para germinar em placa de Petri, em câmara de crescimento, a 30 °C. Letras maiúsculas comparam sementes dormentes com não-dormentes nas colunas (2005 com 2006 e 2010 com 2011) e minúsculas comparam as linhas, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

Tratamentos, mol dm ⁻³	2005		2010		2011	
	Não-Dormen	Dormentes	Não-Dormen	Dormentes	Não-Dormen	Dormentes
tris-HCl	12,0 ± 2,6 Ea	3,6 ± 0,7 Fb	0,8 ± 0,5 Fb	0	0	Fb
Escarif mecânica	94,8 ± 1,0 Aa	10,0 ± 2,0 Eb	81,2 ± 1,5 Aa	5,2 ± 2,6 Eb		
pH 7,0 (troca 12 h)	20,0 ± 2,8 Da	-	0	Fb	0	Fb
pH 3,0 (troca 12 h)	19,6 ± 0,4 Da	-	1,2 ± 0,8 Fb	0,8 ± 0,5 Fb		
pH 2,0 (troca 12 h)	24,8 ± 1,4 Cb	-	4,4 ± 1,7 Ec	62,8 ± 2,1 Ba		
ACC 2 x 10 ⁻⁴	18,8 ± 2,7 Da	-	0,8 ± 0,5 Fb	8,4 ± 1,0 Da		
ACC 2 x 10 ⁻³	24,8 ± 2,9 Ca	-	4,0 ± 1,7 Eb	29,6 ± 1,9 Ca		
TU 2 x 10 ⁻¹	20,0 ± 2,8 Db	86,4 ± 2,3 Aa	6,0 ± 1,3 Dc	1,2 ± 0,8 Fd		
BA 2 x 10 ⁻⁵	20,4 ± 3,6 Da	7,6 ± 1,0 Eb	1,6 ± 0,7 Fc	0,4 ± 0,4 Fc		
BA 2 x 10 ⁻⁴	24,8 ± 1,2 Ca	14,8 ± 2,6 Dc	3,2 ± 0,8 Ec	0,8 ± 0,5 Fc		
CEPA 2 x 10 ⁻⁵	19,2 ± 1,7 Da	14,8 ± 1,7 Da	2,8 ± 1,3 Eb	2,4 ± 1,0 Eb		
CEPA 2 x 10 ⁻⁴	23,6 ± 1,0 Cb	42,0 ± 3,7 Ba	4,8 ± 1,2 Dc	53,2 ± 3,5 Ba		
CEPA + BA 2 x 10 ⁻⁵	28,8 ± 1,4 Ca	35,6 ± 2,3 Ba	6,4 ± 1,2 Db	0,8 ± 0,5 Fb		
CEPA + BA 2 x 10 ⁻⁴	24,8 ± 1,2 Cb	84,8 ± 0,5 Aa	6,4 ± 1,5 Dc	4,8 ± 1,8 Dc		

Em todos os demais tratamentos, embora tenha sido bem mais baixa, a germinação de sementes não-dormentes mostrou-se estatisticamente igual ou superior a das sementes dormentes. Nas sementes não-dormentes os maiores níveis de germinação foram obtidos quando as sementes foram coletas em 2005 do que em 2010 em todos os tratamentos. Os reguladores de crescimento que promoveram maior germinação foram TU 2 x 10⁻¹ mol dm⁻³, CEPA 2 x 10⁻⁴ mol dm⁻³, CEPA + BA 2 x 10⁻⁴ mol dm⁻³ e 2 x 10⁻⁵ mol dm⁻³, mostrando que foram as substâncias mais permeantes.

As sementes dormentes exibiram maior permeabilidade aos reguladores de crescimento do que as sementes não-dormentes, uma vez que exibiram maior

germinação. Gillikin e Graham (1991) sugerem que a impermeabilidade do tegumento está associada com a desidratação das sementes durante os estádios finais de maturação. Além disso, Tweddle et al (2003) associam a tolerância à dessecação de diversas sementes com o estabelecimento da dormência física, a paradormência tegumentar, de modo a torná-las mais tolerantes à dessecação. A barreira física à entrada de água é, na maioria das vezes, devida à impermeabilidade das camadas de tecido paliçádico do tegumento e o desenvolvimento dessas camadas coincide com a desidratação durante a maturação. A consequência desse fenômeno é que as sementes chegam a um grau de umidade em que ficam em equilíbrio com o ambiente no momento da dispersão (Tweddle et al 2003) e, por estarem em um estado desidratado, são capazes de sobreviver aos estresses ambientais (De Castro et al 2004).

Com o armazenamento, Hutton e Poter (1937) encontraram que a impermeabilidade do tegumento das sementes da leguminosa *Strophostyles helvola* esteve diretamente relacionada com o seu grau de umidade. Quanto menor o grau de umidade, mais impermeável é o tegumento. Isso pode ser uma explicação para a maior impermeabilidade do tegumento das sementes não-dormentes (armazenadas por mais tempo), uma vez que estas mostraram um menor grau de umidade (6,8%) do que as sementes dormentes (9,3%). Com o armazenamento, as sementes tornam-se mais secas e, portanto, mais impermeáveis.

Apesar de a dormência em sementes ser uma característica determinada por fatores genéticos, sua indução pode, também, ser devida a fatores ambientais durante a maturação. Além disso, um mesmo fator do ambiente pode promover efeitos variáveis, de acordo com a espécie considerada, do mecanismo endógeno envolvido e da possível influência de sementes “vizinhas” no mesmo fruto ou infrutescência (Marcos-Filho 2005). Assim, de acordo com Argel e Humphreys (1993 a, b), a dureza das sementes de

S. hamata está linearmente relacionada com o aumento da temperatura e a baixa umidade do ar, durante a sua formação. Além disso, Cameron (1967) observou diferentes níveis de dureza em *S. humilis*, de acordo com diferentes tempos de florescimento em estações sucessivas, corroborando os dados da Tabela 2. Isso tem uma grande implicação na sucessão ecológica das espécies uma vez que condições quentes durante o florescimento e formação das sementes, induzem a formação de sementes “duras”, que mantêm a longevidade e o banco de sementes do solo (Argel e Humpreys 1993 a). Portanto, as diferenças de germinação encontradas entre as épocas de colheita podem ser devidas às variações de temperatura, umidade e tempo de florescimento ocorridos nos diferentes anos (Carnelossi 1996).

Independentemente de a diferença na permeabilidade do tegumento de sementes dormentes ser devida a fatores ambientais, é de fundamental importância observar que o embrião de estilosante conseguiu vencer a barreira tegumentar quando as sementes foram tratadas com alguns reguladores de crescimento. O embrião das sementes maduras de estilosante mostra-se no estágio *torpedo* de desenvolvimento, quando os frutos são dispersos pela planta (os frutos foram coletados, secos sobre bancada por cinco dias e imediatamente fixados) (Figura 3). Nesse estágio, o embrião sofre alongamento e expansão de suas células e a radícula e o hipocótilo são definidos (Cocucci e Mariath 2004). O embrião de estilosante ocupa praticamente toda a semente (Figura 4), sendo envolto por uma fina camada de endosperma e pelas camadas de tecido que formam o tegumento (Figura 4 c, d). O eixo embrionário possui uma leve inclinação e está oculto por entre os cotilédones (Figura 3). Não foram observadas diferenças entre os tegumentos e embriões de sementes dormentes e não-dormentes (estes com 330 dias de armazenamento). Isso indica que a endodormência é realmente devida a fatores fisiológicos e não estruturais.

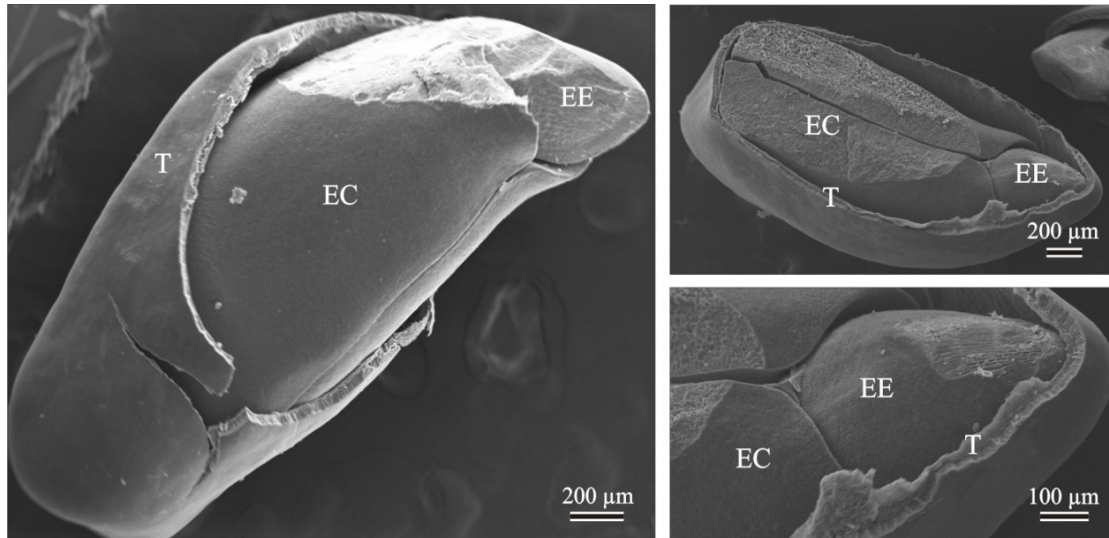


Figura 3 – Embrião de sementes de estilosante no estágio *torpedo*. EC: eixo cotiledonar, EE: eixo embrionário, T: tegumento

O tegumento das sementes de estilosante é similar ao de *S. hamata* (Argel e Humphreys 1993 c) e de algumas outras espécies de leguminosas (De Souza e Marcos-Filho 2001), sendo composto de quatro camadas de tecidos (Figura 4). A mais externa é uma fina cutícula, que pode ser observada apenas sob microscopia de luz. A cutícula pode repelir a água de acordo sua composição, uma vez que pode conter componentes hidrofóbicos (ceras), semi-hidrofóbicos (cutina) e hidrofílicos (pectina e celulose) (Devine et al 1993). A segunda camada abaixo é de tecido paliçádico (Figura 4 c, d), com macroesclereídios alongados e orientados perpendicularmente com a superfície externa da semente. Os macroesclereídios são compactamente distribuídos, com paredes irregularmente espessadas e sem espaços intercelulares. De acordo com Baskin et al (2000), a impermeabilidade do tegumento é essencialmente conferida por esta camada de células e, além disso, Cavanagh (1983), trabalhando com sementes de *Acacia* (Fabaceae), sugerem que sementes com essa estrutura possuem viabilidade muito longa.

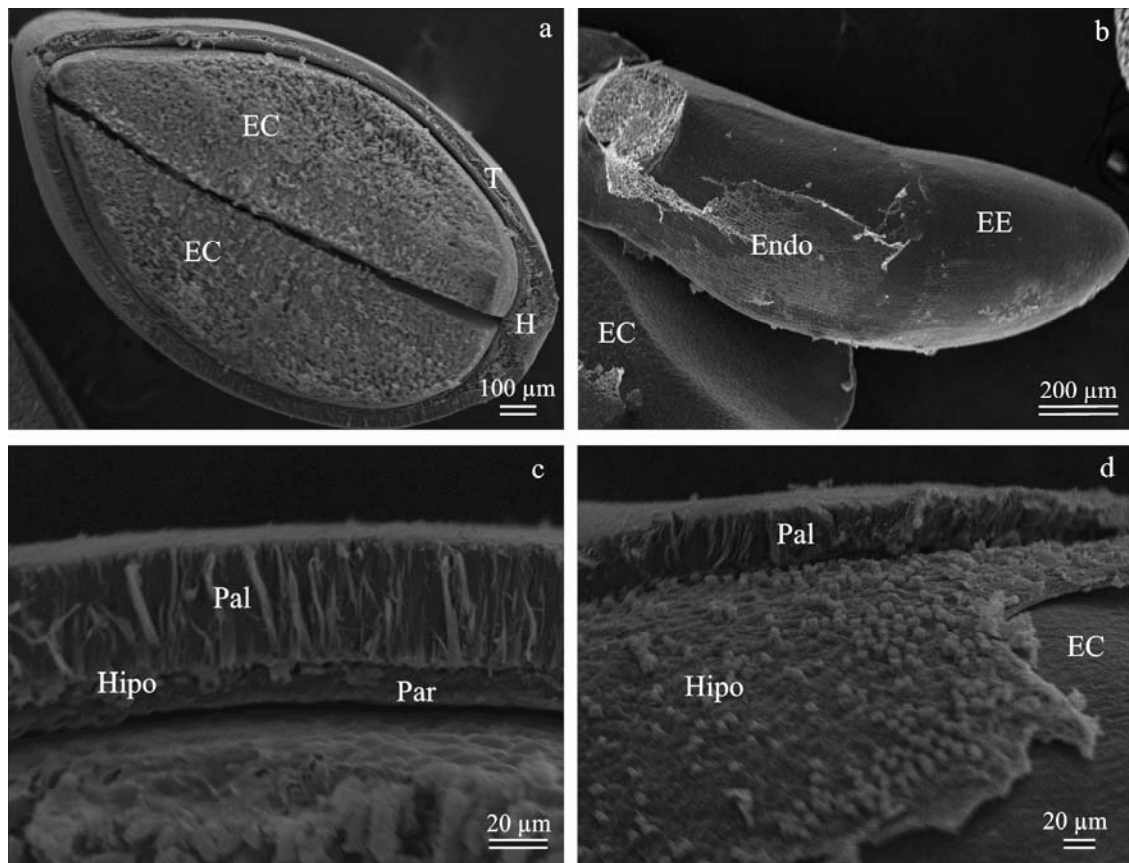


Figura 4 – Eletromicrografias evidenciando o tegumento de sementes de estilosante. a – Visão geral do tegumento recobrando o embrião. b- Detalhe do eixo embrionário e endosperma. c – Camada de tecido paliçádico, hipoderme e parênquima. d – Detalhe da hipoderme. EC: eixo cotiledonar, EE: eixo embrionário, Endo: endosperma, H: hilo, Hipo: hipoderme, Pal: tecido paliçádico, Par: tecido parenquimático, T: tegumento

A terceira camada, de fora para dentro, é a hipoderme, constituída de osteoesclereídios (Figura 4 c, d), que aparecem em toda a região da semente, possuindo grandes espaços aeríferos entre si. A secção mais interna é composta de tecido parenquimático (Figura 4 c), exibindo mais de uma camada de células de paredes finas, tangencialmente alongadas e uniformemente distribuídas pelo tegumento. Toda a extensão do tegumento, exceto na região do hilo, aparentemente exhibe a mesma

espessura. O tegumento é completamente liso e não foi observada nenhuma fissura em toda a sua amplitude.

Nos testes histoquímicos não foram detectados compostos fenólicos, ligninas ou lipídios no tegumento das sementes, tanto em sementes dormentes quanto em não-dormentes. Compostos fenólicos, lipídios e ligninas influenciam a paradormência tegumentar de diversas espécies, incluindo leguminosas (Zeng et al 2005). De acordo com Debeaujon et al (2007), os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, aumentam a paradormência tegumentar de sementes por aumentarem a impermeabilidade do tegumento. No gênero *Pisum* (Fabaceae), as espécies que possuem sementes com tegumento impermeável, como por exemplo *P. elatius*, possuem maiores níveis de compostos fenólicos do que sementes com tegumentos permeáveis como *P. sativum*, de modo que a permeabilidade do tegumento é inversamente proporcional ao conteúdo de compostos fenólicos no tegumento. Além disso, ácidos fenólicos como caféico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e vanílico, são considerados como possíveis inibidores da germinação, já que sua aplicação pode reduzir a germinação de sementes (Debeaujon et al 2007). De maneira semelhante, Zeng et al (2005) também associaram o conteúdo de lipídios com a impermeabilidade do tegumento. Esses autores observaram que a perda da paradormência tegumentar está relacionada à diminuição de lipídios no tegumento, uma vez que a composição química dos lipídios que compõem a cutícula pode ser alterada por aumentos de temperatura.

De acordo com Serrato-Valenti et al (1993), as sementes de *S. scabra* também não apresentam ligninas em seu tegumento, mas foi detectada uma baixa concentração de lipídios e compostos fenólicos nas camadas de tecido paliçádico. Assim, a impermeabilidade do tegumento das sementes de estilósante é devida especialmente à compactação dos macroesclereídios, que estão uniformemente distribuídos, sem espaços

intracelulares, que impediriam entrada de água na semente. Porém, pode ser que em uma pequena proporção, a composição química do tegumento também influencie essa impermeabilidade (observação pessoal). No entanto, para que isso se comprove, outros testes histoquímicos (por exemplo, para detectar-se a presença de calose, polissacarídeos em geral, celulose) ou experimentos analíticos de quantificação (empregando, por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), que conseguem verificar se realmente os compostos fenólicos e lipídios estão presentes no tegumento das sementes), precisam ser realizados para investigar-se a natureza do tegumento de estilósante e esclarecer melhor os resultados encontrados.

Devido à impermeabilidade conferida pelos macroesclereídios do tegumento e pelo enorme tamanho relativo do embrião em relação à semente, embora não tenha sido realizado nenhum experimento para avaliar a força que o embrião exerce para romper o tegumento das sementes, pode-se presumir que a barreira causada pelo tegumento provavelmente impõe maior limitação à entrada de água no embrião do que à expansão do embrião. Isso também se evidencia pelo fato de que sementes não-dormentes germinam quando algum tratamento de escarificação do tegumento, que permita a entrada de água e gases, é realizado, possibilitando o crescimento do embrião, que conseqüentemente, rompe o tegumento.

4.4 Escarificação ácida

Outra maneira de se quebrar a paradormência tegumentar das sementes de estilósante é por meio da escarificação ácida, i. e., pela imersão das sementes em ácidos, uma vez que alguns ácidos causam abrasão do tegumento das sementes (Footitt e Cohn 1992), o que possibilitaria a entrada de água e de reguladores de crescimento na

semente. Obviamente, quando não são adicionados reguladores de crescimento capazes de quebrar a endodormência de estilósante, apenas as sementes não-dormentes respondem aos ácidos, mostrando que seu efeito é o de provocar a abrasão do tegumento e não o de promover uma condição ácida que poderia levar à produção de etileno e quebra da dormência (Pelacani 2003) (Tabela 3). Porém, embora os mais altos níveis de germinação tenham ocorridos com 10 e 15 min de imersão em H₂SO₄, nesses tempos foram observados efeitos deletérios do ácido, uma vez que ocorreu escurecimento da ponta da radícula das plântulas formadas (dados não mostrados). Sabe-se que o aumento do tempo de imersão de sementes dormentes e não-dormentes em H₂SO₄ pode reduzir a emergência e o crescimento de plântulas, por danos ao embrião (Alves et al 2006).

Tabela 3 – Comparação da germinação de sementes dormentes (seis dias de idade pós-colheita) e não-dormentes (240 dias) submetidas a diferentes tempos de imersão em H₂SO₄. Médias seguidas mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade

Tratamento	Dormente	Não-dormente
Intactas	0,4 ± 0,4 d	1,6 ± 0,7 d
Escarif mecânica	0,4 ± 0,4 d	81,6 ± 0,8 a
15 s	0,0 d	2,8 ± 0,8 d
30 s	0,0 d	5,6 ± 1,5 c
45 s	0,8 ± 0,5 d	11,2 ± 2,9 c
1 min	0,0 d	11,6 ± 2,4 c
2,5 min	0,0 d	47,2 ± 8,8 b
5 min	0,0 d	33,6 ± 5,3 b
10 min	1,6 ± 0,7 d	70,4 ± 4,8 a
15 min	3,6 ± 1,7 d	91,2 ± 2,6 a

A escarificação ácida com ácido clorídrico (HCl), por sua vez, não foi tão eficiente em quebrar a paradormência tegumentar, já que as sementes não-dormentes não exibiram germinação expressiva (Tabela 4). É possível que o HCl não tenha sido capaz de provocar uma abrasão significativa do tegumento das sementes. Estudos em que sementes possuem sua paradormência tegumentar quebrada com H₂SO₄, mas não com HCl, são relativamente comuns. Em um deles, Figueiredo e Popinigis (1979) atribuem que a baixa germinação encontrada em sementes de malva tratadas com HCl se deva a uma maior mortalidade das sementes em relação ao tratamento com H₂SO₄, porém as causas que levaram à morte daquelas sementes não foram investigadas.

Tabela 4 – Germinação de sementes não-dormentes com 460 dias de idade pós colheita submetidas a diferentes tempos de imersão em HCl. Médias seguidas mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

Tratamento, imersão	Não-dormente
Intactas	12,0 ± 1,1 b
Escarif mecânica	90,8 ± 1,6 a
1 min	10,0 ± 3,6 b
2,5 min	10,0 ± 3,3 b
5 min	16,4 ± 3,1 b
10 min	14,0 ± 1,9 b
15 min	9,6 ± 2,8 b
30 min	8,0 ± 1,9 b

Embora a germinação das sementes não-dormentes imersas em H₂SO₄ por 10 e 15 min tenha sido semelhante à com escarificação mecânica, tempos de imersão em H₂SO₄ iguais ou superiores a 2,5 min seguidos de posterior aplicação de reguladores de crescimento foram suficientes para promover germinação igual à escarificação

mecânica, independentemente do regulador utilizado (Tabela 5), mostrando que a abrasão do tegumento por aqueles períodos de tempos foi eficaz.

Tabela 5 – Resposta de sementes não-dormentes de estilosante com 240 dias de idade pós-colheita, a diversos reguladores de crescimento, em função do tempo de imersão prévia das sementes em H₂SO₄. Letras maiúsculas comparam os diferentes reguladores dentro em um mesmo tempo de imersão (colunas) e minúsculas o efeito de cada regulador em separado (linhas), dentro dos quatro tempos de imersão, pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

Tratamento, mol dm ⁻³	Tempo de imersão no H ₂ SO ₄			
	45 s	1 min	2,5 min	5 min
TU 10 ⁻²	4,0 ± 1,1 Db	11,6 ± 3,7 Cb	27,2 ± 8,3 Ba	42,8 ± 9,3 Aa
TU 10 ⁻¹	24,0 ± 4,4 Bd	56,8 ± 4,4 Cb	92,0 ± 2,3 Aa	72,0 ± 9,3 Ba
CEPA 10 ⁻⁵	14,4 ± 2,6 Cc	43,2 ± 3,3 Bb	82,0 ± 3,1 Aa	87,2 ± 2,0 Aa
CEPA 10 ⁻⁴	25,6 ± 1,2 Cc	37,6 ± 4,8 Bb	74,0 ± 1,9 Aa	77,3 ± 3,4 Aa
BA 10 ⁻⁵	17,6 ± 2,5 Cc	44,8 ± 2,5 Bb	83,6 ± 4,5 Aa	74,0 ± 3,7 Aa
BA 10 ⁻⁴	16,0 ± 2,0 Cc	46,0 ± 4,0 Bb	86,0 ± 3,0 Aa	82,8 ± 2,6 Aa
CEPA + BA 10 ⁻⁵	18,0 ± 2,5 Cc	51,6 ± 3,8 Bb	83,2 ± 1,0 Aa	88,0 ± 2,7 Aa
CEPA + BA 10 ⁻⁴	22,0 ± 1,4 Cc	45,2 ± 4,3 Bb	89,2 ± 4,5 Aa	86,4 ± 1,7 Aa

Germinação de sementes intactas: 1,6 ± 0,7%

Germinação de sementes escarificadas mecanicamente: 81,6 ± 1,6%

As sementes dormentes tiveram sua dormência parcialmente quebrada quando foram imersas em H₂SO₄ por 45 s, e posteriormente colocadas nos reguladores de crescimento TU 10⁻¹ mol dm⁻³ e CEPA + BA 10⁻⁴ mol dm⁻³. Porém, em tempos iguais ou superiores a 1 min de imersão em H₂SO₄ seguida de aplicação de TU 10⁻¹ mol dm⁻³, a germinação foi superior a 70%, valor próximo ao de percentagem de germinação encontrado em sementes não-dormentes escarificadas mecanicamente (Tabela 6). Com 5 min de imersão em H₂SO₄, o tratamento CEPA + BA 10⁻⁴ mol dm⁻³ também

promoveu mais de 70% de germinação das sementes Assim, os reguladores mais eficientes em quebrar a dormência após a imersão em H_2SO_4 foram $\text{TU } 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ e $\text{CEPA} + \text{BA } 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. E, obviamente, após o tratamento com H_2SO_4 , em resposta aos reguladores de crescimento, o embrião pode crescer e germinar, tanto em sementes dormentes quanto em não-dormentes.

Tabela 6 – Resposta de sementes dormentes de estilosante com seis dias de idade pós-colheita a diversos reguladores de crescimento, em função do tempo de imersão prévio de sementes em H_2SO_4 . Letras maiúsculas comparam os diferentes reguladores dentro de um mesmo tempo de imersão (colunas) e minúsculas o efeito de cada regulador em separado dentro dos quatro tempos de imersão (linhas), pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade

Tratamento, mol dm^{-3}	Tempos de imersão no H_2SO_4			
	45 s	1 min	2,5 min	5 min
$\text{TU } 10^{-2}$	$7,2 \pm 1,8 \text{ Ca}$	$11,6 \pm 4,6 \text{ Ba}$	$17,6 \pm 6,5 \text{ Ca}$	$7,6 \pm 2,3 \text{ Ba}$
$\text{TU } 10^{-1}$	$40,4 \pm 3,9 \text{ Ab}$	$76,4 \pm 8,5 \text{ Aa}$	$76,4 \pm 2,1 \text{ Aa}$	$87,2 \pm 2,6 \text{ Aa}$
$\text{CEPA } 10^{-5}$	$2,0 \pm 1,1 \text{ Db}$	$4,4 \pm 2,0 \text{ Cb}$	$1,2 \pm 0,5 \text{ Db}$	$10,8 \pm 3,4 \text{ Ba}$
$\text{CEPA } 10^{-4}$	$5,2 \pm 1,0 \text{ Aa}$	$1,6 \pm 0,4 \text{ Ba}$	$1,2 \pm 0,5 \text{ Ba}$	$2,7 \pm 1,5 \text{ Ba}$
$\text{BA } 10^{-5}$	$2,0 \pm 0,6 \text{ Da}$	$0,4 \pm 0,4 \text{ Ca}$	$0,8 \pm 0,5 \text{ Da}$	$1,6 \pm 0,7 \text{ Ca}$
$\text{BA } 10^{-4}$	$0,8 \pm 0,5 \text{ Da}$	$1,6 \pm 0,8 \text{ Ca}$	$2,0 \pm 0,7 \text{ Da}$	$4,4 \pm 2,1 \text{ Ca}$
$\text{CEPA} + \text{BA } 10^{-5}$	$2,8 \pm 1,5 \text{ Db}$	$12,0 \pm 1,9 \text{ Ba}$	$9,2 \pm 1,6 \text{ Ca}$	$15,6 \pm 4,7 \text{ Ba}$
$\text{CEPA} + \text{BA } 10^{-4}$	$22,0 \pm 2,0 \text{ Ac}$	$54,8 \pm 3,1 \text{ Ab}$	$51,2 \pm 3,9 \text{ Ab}$	$79,6 \pm 3,6 \text{ Aa}$

Germinação de sementes intactas: $0,8 \pm 0,4\%$

Germinação de sementes escarificadas mecanicamente: $1,6 \pm 1,0\%$

Quando são comparadas a germinação total de sementes dormentes e não-dormentes em resposta aos reguladores de crescimento após a imersão em H_2SO_4 , observou-se que, em geral, a germinação das sementes não-dormentes é igual ou

superior a das sementes dormentes (Tabelas 5 e 6). O único regulador que promoveu a germinação das sementes dormentes em nível superior ao das não-dormentes foi a TU $10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$, nos tempos de imersão por 45 s e 1 min. Nesses tempos, conforme dito anteriormente, quando as sementes foram apenas escarificadas com H_2SO_4 , sem os reguladores, a percentagem de germinação foi baixa, indicando que não ocorreu escarificação completa do tegumento (Tabela 3). Porém, a TU $10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$, no experimento com sementes intactas (Tabela 2), propiciou maiores níveis de germinação de sementes dormentes do que das não-dormentes. Assim, o fato de as sementes dormentes escarificadas com H_2SO_4 por 45 s e 1 min e tratadas com TU $10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ terem germinado mais do que as não-dormentes pode ser devido à uma maior permeabilidade do tegumento à TU das sementes dormentes em relação às não dormentes.

A imersão das sementes em H_2SO_4 causa ruptura do tegumento, uma vez que expõe o lúmen dos macroesclereídios, permitindo a embebição de água, o que desencadeia a germinação de sementes não-dormentes (Nikoleave 1977). Durante a germinação, a absorção de água promove o “amolecimento” do tegumento, o aumento do volume do embrião e dos tecidos de reserva, facilitando a ruptura do tegumento, a difusão gasosa e a emergência da radícula. Proporciona, ainda, a difusão de hormônios e também a ativação de sistemas enzimáticos. Com isso, desenvolvem-se a degradação, a translocação e a assimilação das reservas, resultando no crescimento do embrião (Marcos-Filho 2005).

A escarificação de sementes com H_2SO_4 é bastante empregada na quebra da paradormência tegumentar. Observa-se uma grande variação na eficácia dos tempos de imersão das sementes de *Stylosanthes* em H_2SO_4 . Em *S. hamata*, *S. guianensis* e *S. scabra*, Nan et al (1998) encontraram que 6 min de imersão em H_2SO_4 são suficientes

para obterem-se resultados positivos na germinação das sementes. Araújo et al (2000), trabalhando com *S. viscosa* encontraram que os melhores resultados de germinação foram obtidos com 10 min de imersão. No entanto, tempos de imersão de 5, 10, e 20 min não promoveram escarificação satisfatória em *S. macrocephala* e provocaram aumento no número de sementes mortas em *S. capitata* (Carmona et al 1986). Rolston (1978) menciona haver necessidade de determinar-se o melhor tempo de imersão das sementes no ácido, uma vez que o excesso de exposição pode causar ruptura de células essenciais do tegumento, favorecendo a invasão por fungos, injúrias mecânicas e danos ao embrião.

Além dos diferentes tempos utilizados na escarificação ácida, a concentração de ácido adequada também varia entre as diferentes espécies (Araújo et al 1996). E não apenas tratamentos de escarificação com H₂SO₄ são empregados na quebra da dormência de leguminosas, havendo na verdade uma grande diversidade de tratamentos que podem ser aplicados. Por exemplo, Bhatt et al (2008) mostraram que sementes de espécies de *Stylosanthes* germinam mais rapidamente quando escarificadas mecanicamente do que quando tratadas com ácido ou água quente, enquanto Mott e McKeon (1979) observaram que o tratamento térmico colocando-se as sementes sobre chapas de alumínio aquecidas foi mais efetivo do que o tratamento com calor seco em fornos com temperatura controlada. Segundo Amri (2010), a imersão em água quente foi o tratamento que propiciou os melhores resultados de germinação da leguminosa *Swartzia madagascariensis*.

Essa variação de resultados encontrados é certamente devida aos diferentes efeitos que cada tratamento de escarificação causa nas sementes (Figura 3) e às diferenças anatômicas das sementes das diferentes espécies. As sementes do estilósante possuem o tegumento completamente liso, sem nenhuma rachadura, independentemente

de estarem dormentes ou não-dormentes. Os únicos orifícios observados na semente são o hilo e a micrópila, que estão localizados um ao lado do outro (Figura 3 a). O hilo é heterocrômico, uma vez que possui coloração mais escura do que o restante da semente, e tem formato circular.

Quando as sementes, dormentes e não-dormentes, foram escarificadas com lixa, os danos ocorreram preferencialmente na sua porção encurvada, especialmente na extremidade pontiaguda da semente por onde ocorre a protrusão da radícula (Figura 3 b). Observa-se que a presença dessa “ponta” na semente protege o hilo e a micrópila dos danos causados pela escarificação com lixa. Por microscopia de luz, foi observado que a lixa rompe a cutícula e os macroesclereídios (células do tecido paliçádico) da região onde a lixa passa e separa essas células dos demais tecidos componentes do tegumento (hipoderme e tecido parenquimático). Assim, a escarificação mecânica cria uma espécie de fenda que permite que a água entre na semente (Figura 4).

A escarificação ácida, por sua vez, corroe algumas regiões do tegumento da semente, criando depressões (Figura 3 c). Quando essas depressões estão próximas umas das outras, uma rachadura ligando as diferentes depressões é formada no tegumento da semente (Figura 3 d). O aumento do tempo de imersão das sementes no ácido faz com que ocorra aumento do número de depressões (Figura 3 e) e, conseqüentemente, mais rachaduras são formadas. A entrada de água pode ocorrer tanto nas depressões quanto nas rachaduras, uma vez que as corrosões ocorrem na cutícula e células do tecido paliçádico já com apenas 1 min de imersão em H_2SO_4 . Com 5 min de imersão, a corrosão pode chegar a todos os tecidos do tegumento (Figura 4). Assim, é importante que o tempo de imersão não seja excessivo a ponto de corroer o embrião, como provavelmente ocorre em tempos de imersão superiores a 5 min.

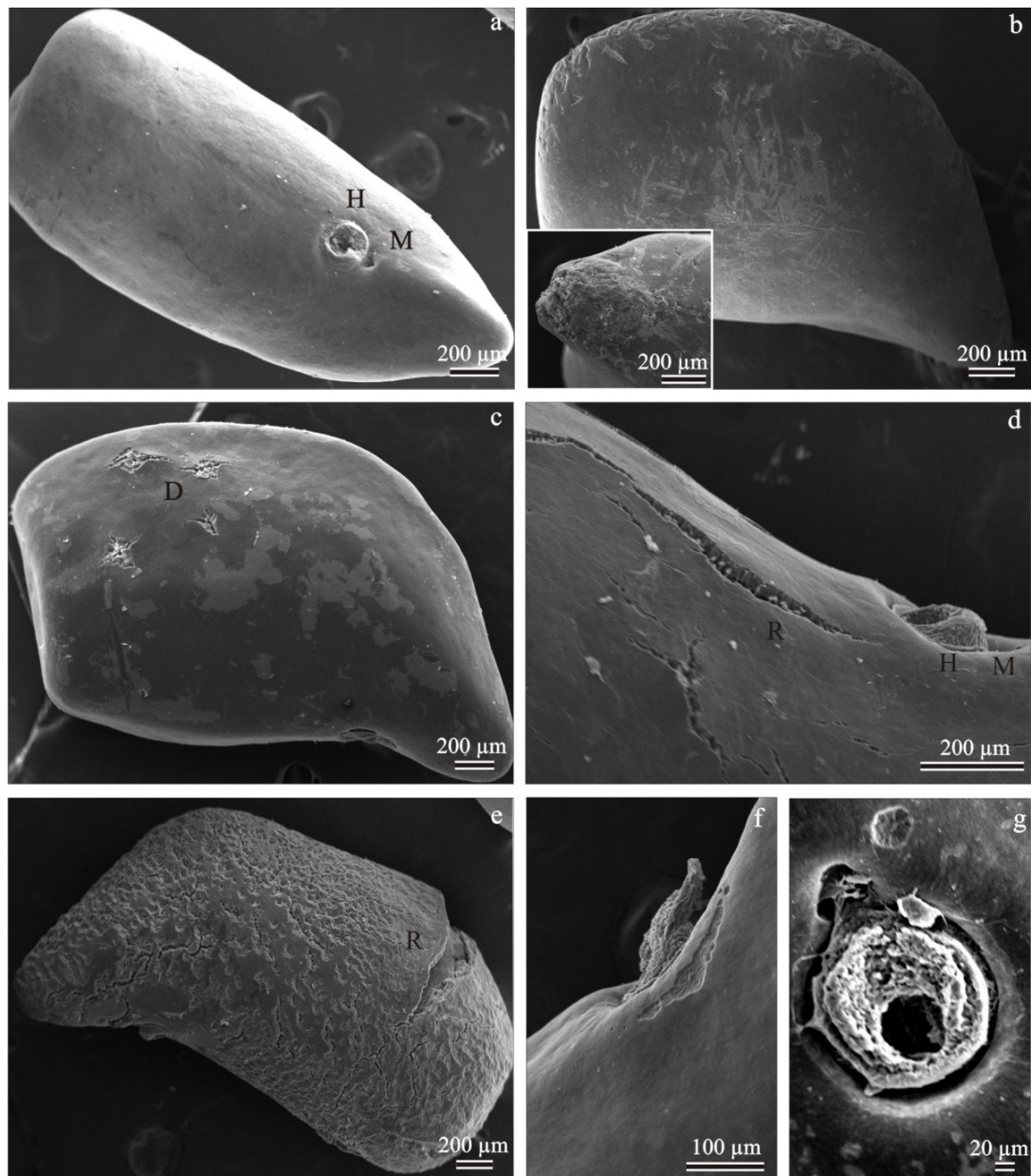


Figura 3 – Sementes de estilósante (dormentes e não-dormentes) submetidas à escarificação. a – Semente intacta, lisa e com o hilo e a micrópila sem danos. b – Semente escarificada com lixa. Os danos causados pela lixa ocorrem preferencialmente na região encurvada e na extremidade em que ocorre a protrusão da radícula (detalhe). c – Semente escarificada com H_2SO_4 , por 1 min. d – Detalhe das rachaduras provocadas pela escarificação com H_2SO_4 , por 1 min. e – Semente escarificada com H_2SO_4 , por 5 min. f, g – danos causados ao redor do hilo e da micrópila de sementes imersas em H_2SO_4 por 5 min. H: hilo, M: micrópila, D: depressão, R: rachadura

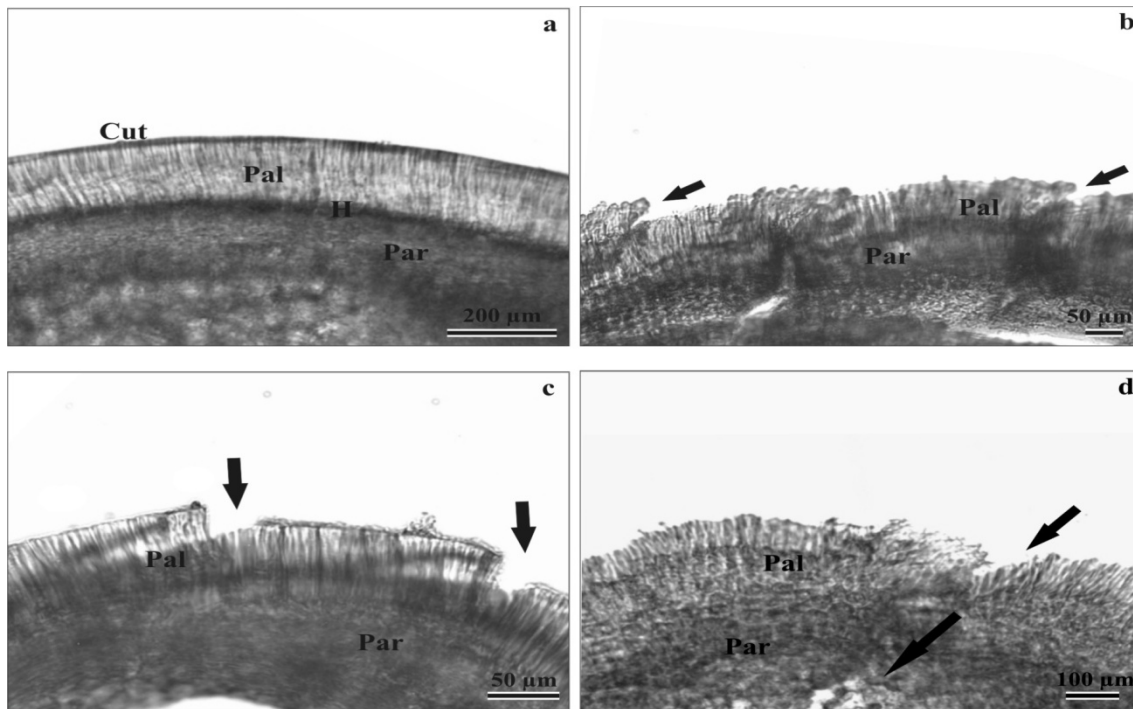


Figura 4 – Sementes de estilosante (dormentes e não-dormentes) submetidas a diferentes tratamentos de escarificação. a – Semente intacta. b – Semente escarificada com lixa. c – Semente escarificada por 1 min com H_2SO_4 . d – Semente escarificada por 5 min com H_2SO_4 . Cut: cutícula, Pal: tecido paliçádico, H: hipoderme, Par: tecido parenquimático. As setas indicam os danos causados pelos tratamentos de escarificação

Outro dano observado nas sementes tratadas com ácido é uma corrosão ao redor do hilo e micrópila (Figura 3 f, g). Já com 5 min de imersão em H_2SO_4 , foi possível perceber que algumas camadas de células do hilo descolam-se do tegumento. Alguns autores consideram que o hilo, assim como a micrópila e o estrofiolo atuam como sítios específicos de entrada de água em leguminosas (Agbo et al 1987). Porém, para Hyde (1954), o hilo atua como uma válvula higroscópica apenas nos estádios finais de maturação, abrindo-se quando a umidade do ar é baixa e fechando-se quando é alta, para prevenir a absorção de água pela semente, de modo a manter um equilíbrio com a

atmosfera. Essa situação mantém-se até o final da maturação da semente, quando o conteúdo de água chega a cerca de 10%, e o hilo fecha-se completamente, mantendo uma condição de absoluta impermeabilidade. Essa observação está de acordo com os resultados encontrados em sementes de estilosante, uma vez que sementes intactas não germinam quando são colocadas para embeberem-se em água, demonstrando que o hilo mantém-se impermeável.

A ruptura do tegumento pelos diferentes métodos de escarificação, além de aumentar a permeabilidade do tegumento a água e gases, pode induzir o aumento da sensibilidade da semente à luz e temperatura e pode remover inibidores e promotores da germinação do tegumento, influenciando, assim, o metabolismo da semente (Mundim e Salomão 1999). Porém, a manutenção de uma estrutura rija como o tegumento das sementes de estilosante desempenha um importante papel ecológico. É sabido que um tegumento de estrutura acurada, sem danos, constitui-se na melhor proteção contra flutuações de umidade e temperatura que poderiam danificar o embrião ou facilitar a instalação de microrganismos (Mohamed-Yasseen et al 1994).

4.5 Escarificação mecânica após imersão nos reguladores

A permeabilidade do tegumento das sementes também foi examinada escarificando-se mecanicamente as sementes após terem sido imersas nas soluções dos reguladores de crescimento. A possível germinação de sementes dormentes após a escarificação, depois de terem sido colocadas em placa de Petri no meio basal, indica que o regulador foi capaz de penetrar o tegumento, quebrar a dormência das sementes e promover o crescimento do embrião, que se tornou capaz de romper a barreira tegumentar. A escarificação posterior indica que a germinação deveria aumentar em

número e em velocidade, em relação às sementes não escarificadas tratadas com os reguladores (subtópico 4.3 – Germinação de sementes intactas tratadas com reguladores), mas o conceito de permeabilidade dos reguladores no tegumento nos dois experimentos é o mesmo.

As sementes dormentes escarificadas após o tratamento com os reguladores tiveram a dormência parcialmente quebrada, independentemente de o tratamento com os reguladores ter sido feito por imersão em soluções em béquer (Tabela 7) ou em papel de filtro embebido em placa de Petri (maior disponibilidade de oxigênio, em relação à imersão no béquer) (Tabela 8). Nessas duas condições, os reguladores de crescimento mais eficazes foram TU 10^{-1} mol dm⁻³, ACC 10^{-3} mol dm⁻³, BA 10^{-4} mol dm⁻³ e CEPA + BA 10^{-4} mol dm⁻³. Porém, a imersão das sementes em béquer propiciou também a eficácia dos seguintes reguladores: CEPA 10^{-4} mol dm⁻³, BA + GA₃ 10^{-4} mol dm⁻³, e CEPA + BA + GA₃ 10^{-4} mol dm⁻³.

O tempo de tratamento das sementes, tanto em placa de Petri quanto em béquer, afetou a germinação das sementes, uma vez que em todos os tratamentos, a imersão das sementes nos reguladores por 48 e 72 h proporcionou maior germinação do que na imersão por apenas 24 h (Tabelas 7 e 8). Nesses experimentos, mesmo com o aumento do tempo de imersão nos reguladores, a germinação foi baixa em comparação com o experimento de sementes intactas (Tabela 2), parecendo que não houve penetração forte dos reguladores de crescimento no tegumento das sementes. Por outro lado, a concentração dos reguladores de crescimento utilizada nesse experimento de escarificação após imersão foi a metade da concentração utilizada no experimento com sementes intactas. E, como ocorreu a germinação das sementes (mesmo que num nível mais baixo), deduz-se que os reguladores hajam penetrado o tegumento e que, com a escarificação e entrada de maior quantidade de água na semente, o embrião pôde crescer

e romper o tegumento. O estímulo à germinação, portanto, ocorreu anteriormente à escarificação mecânica, com a imersão das sementes na solução dos reguladores. Obviamente, a germinação somente ocorre se os reguladores de crescimento tiverem sido capazes de penetrar no tegumento e atingir o embrião para que esse possa crescer e romper o tegumento.

Tabela 7 – Germinação de sementes dormentes com 25 dias de idade pós-colheita, submetidas a diferentes tempos de imersão em diferentes soluções de reguladores de crescimento, em béquer (10 cm³ cada). Após a imersão, as sementes foram escarificadas e levadas a germinar em placa de Petri. Letras maiúsculas comparam todos os valores da tabela e as minúsculas linhas, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade

Tratamento, mol dm ⁻³	Tempo de imersão das sementes		
	24 h	48 h	72 h
Intactas	0,0 Da	0,8 ± 0,5 Da	0,8 ± 0,5 Da
Escarif mecânica	3,2 ± 2,6 Ca	1,8 ± 0,5 Da	1,2 ± 0,5 Da
Intactas, após imersão	0,0 Da	0,0 Da	0,0 Da
Escarif mecânica, após imersão	0,4 ± 0,4 Da	7,2 ± 1,2 Ba	5,2 ± 1,9 Ba
ACC 10 ⁻³	3,2 ± 1,5 Ca	7,6 ± 1,5 Ba	10,6 ± 1,7 Aa
TU 10 ⁻¹	2,0 ± 0,6 Cb	10,4 ± 2,8 Aa	12,8 ± 3,1 Ca
TU 10 ⁻²	1,6 ± 0,7 Cb	9,2 ± 2,6 Ba	4,4 ± 1,0 Aa
CEPA 10 ⁻⁴	4,8 ± 1,0 Cb	7,6 ± 2,0 Ba	12,4 ± 2,0 Aa
BA 10 ⁻⁴	2,8 ± 0,8 Cb	12,0 ± 1,9 Aa	13,2 ± 2,4 Aa
GA ₃ 10 ⁻⁴	2,4 ± 1,1 Ca	7,2 ± 2,9 Ba	4,0 ± 1,4 Ca
CEPA + BA 10 ⁻⁴	2,0 ± 0,9 Cb	14,4 ± 2,8 Aa	8,8 ± 1,5 Ba
CEPA + GA ₃ 10 ⁻⁴	0,8 ± 0,5 Db	8,0 ± 2,0 Ba	8,4 ± 1,0 Ba
BA + GA ₃ 10 ⁻⁴	1,6 ± 1,0 Dc	16,8 ± 1,9 Aa	6,0 ± 0,6 Bb
CEPA + BA + GA ₃ 10 ⁻⁴	2,8 ± 0,5 Cb	13,6 ± 3,6 Aa	8,4 ± 1,5 Ba

Qualitativamente, o efeito dos reguladores de crescimento foi praticamente o mesmo nos experimentos com sementes intactas (Tabela 2), imersas nos reguladores e com sementes escarificadas após o tratamento com reguladores (Tabela 7). Em ambos

os experimentos (Tabelas 2 e 7), os reguladores TU 10^{-1} mol dm⁻³, ACC 10^{-4} mol dm⁻³ e CEPA + BA 10^{-4} mol dm⁻³ alcançaram boa penetração no tegumento. O regulador CEPA 10^{-4} mol dm⁻³ mostrou uma penetração eficiente apenas no experimento com sementes intactas, enquanto a BA 10^{-4} mol dm⁻³ promoveu altos níveis de germinação apenas no experimento com sementes escarificadas após o tratamento com reguladores. Porém, essas diferenças podem ser devidas aos diferentes lotes de sementes utilizados.

Tabela 8 – Germinação de sementes dormentes com 25 dias de idade pós-colheita, submetidas a diferentes tempos de exposição a diferentes reguladores de crescimento em papel de filtro embebido em placa de Petri (20 cm³ cada). Após a exposição, as sementes foram escarificadas e levadas a germinar em placa de Petri. Letras maiúsculas comparam todos os valores da tabela e as minúsculas as linhas, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade

Tratamento, mol dm ⁻³	Tempo de imersão das sementes		
	24 h	48 h	72 h
Intactas	0,8 ± 0,5 Da	0,8 ± 0,5 Da	0,8 ± 0,5 Da
Escarif mecânica	0,8 ± 0,5 Da	1,2 ± 0,5 Da	1,2 ± 0,5 Da
Intactas, após a imersão	0,8 ± 0,5 Da	0,4 ± 0,4 Da	0,0 Da
Escarif mecânica, após imersão	8,0 ± 3,0 Ba	3,6 ± 1,2 Ca	4,8 ± 1,0 Ba
ACC 10^{-3}	1,6 ± 0,7 Db	2,8 ± 1,0 Cb	10,2 ± 2,0 Aa
TU 10^{-1}	4,4 ± 1,2 Bb	13,6 ± 2,3 Aa	11,6 ± 3,3 Aa
TU 10^{-2}	2,8 ± 0,5 Cb	8,8 ± 2,8 Ba	9,6 ± 2,9 Ba
CEPA 10^{-4}	0,8 ± 0,8 Db	4,8 ± 1,6 Ca	7,2 ± 1,0 Ba
BA 10^{-4}	5,2 ± 1,3 Bb	15,2 ± 2,7 Aa	17,6 ± 1,8 Aa
GA ₃ 10^{-4}	3,2 ± 1,2 Ca	4,4 ± 1,9 Ba	0,8 ± 0,5 Db
CEPA + BA 10^{-4}	3,2 ± 1,3 Cb	3,6 ± 1,2 Cb	11,2 ± 2,6 Aa
CEPA + GA ₃ 10^{-4}	0,8 ± 0,5 Db	2,0 ± 1,0 Bb	7,6 ± 1,3 Ba
BA + GA ₃ 10^{-4}	2,8 ± 1,5 Cc	7,6 ± 1,5 Db	7,2 ± 1,7 Bb
CEPA + BA + GA ₃ 10^{-4}	1,6 ± 0,7 Db	3,2 ± 1,0 Cb	7,2 ± 1,8 Ba

A barreira tegumentar também dificultou a penetração dos inibidores de germinação. Mesmo com o aumento do tempo de imersão de 24 para 72 h, a

germinação das sementes não-dormentes foi superior a 90% em todos os tratamentos. Mesmo que os inibidores possam ter penetrado vagarosamente pelos tegumentos, com a posterior escarificação e entrada de água nas sementes, os inibidores absolutamente não foram eficientes em inibir a germinação (Tabela 9). Uma possível explicação para a ineficácia dos inibidores é a de que o início do processo germinativo tenha ocorrido muito antes de os inibidores conseguirem atingir os tecidos alvo. De acordo com Pelacani (2005), a síntese de etileno em sementes não-dormentes inicia-se já a partir de 6 h de imersão das sementes, processo irreversível, de modo que os inibidores não teriam sido capazes de inibir a germinação das sementes.

Tabela 9 – Germinação de sementes não-dormentes, com 300 dias de idade pós-colheita, submetidas a diferentes soluções de inibidores por 72 h, por imersão em béquer (10 cm⁻³ de solução cada) e em placa de Petri de 150 mm (20 cm⁻³ de solução cada). Após a exposição, as sementes foram escarificadas e levadas a germinar em placa de Petri. Letras maiúsculas comparam todos os valores da tabela e minúsculas as linhas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Tratamento, mol dm ⁻³	Tempo de exposição	
	72 h em béquer	72 h em placa
Intactas	1,6 ± 0,7 Ba	1,2 ± 0,8 Ba
Escarif mecânica	91,2 ± 3,2 Aa	93,2 ± 4,2 Aa
Intactas, após a imersão	0,8 ± 0,5 Ba	5,6 ± 1,4 Ba
Escarif mecânica, após imersão	92,0 ± 2,6 Aa	94,4 ± 1,5 Aa
ABA 10 ⁻⁴	95,2 ± 1,6 Aa	91,4 ± 1,6 Aa
AOA 10 ⁻³	93,2 ± 3,8 Aa	97,6 ± 0,7 Aa
AVG 10 ⁻⁴	98,8 ± 5,7 Aa	90,8 ± 1,9 Aa
Co ²⁺ 10 ⁻³	91,6 ± 4,8 Aa	91,6 ± 1,7 Aa
AVG 10 ⁻⁴ + Co ²⁺ 10 ⁻³	89,8 ± 4,3 Aa	85,2 ± 1,2 Aa

5 CONCLUSÕES

O tegumento das sementes de estilosante (*Stylosanthes humilis* H.B.K.) impõe uma barreira física à germinação, provavelmente devido aos macroesclereídios que compõem o tecido paliçádico de maneira uniforme, sem espaços intracelulares. Até certo ponto, alguns reguladores de crescimento podem penetrar vagarosamente no tegumento intacto e estimular a germinação de sementes dormentes e não-dormentes, talvez por promover o crescimento do embrião que, assim romperia o tegumento. A permeabilidade das sementes dormentes aos reguladores mostrou-se maior do que a das sementes não-dormentes, embora em ambas a penetração dos reguladores tenha sido lenta e vagarosa. Os reguladores que mais penetraram no tegumento das sementes foram ACC $2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, TU $2 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$, CEPA $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, BA $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, CEPA + BA $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ e CEPA + BA $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Quando as sementes dormentes foram tratadas com os promotores e posteriormente escarificadas ocorreu quebra parcial da dormência das sementes, em especial sob imersão por 48 e 72 h, sugerindo que realmente os reguladores de crescimento atingiram o embrião.

Quando escarificadas mecanicamente com lixa d'água ou quimicamente pela imersão em H_2SO_4 (por 5 min), as sementes tiveram sua paradormência tegumentar quebrada. Os tratamentos de escarificação mecânica promovem ruptura da cutícula e dos macroesclereídios, enquanto a escarificação ácida provoca abrasão das células no tegumento, em maior ou menor profundidade, de acordo com o tempo de imersão no ácido. Os tratamentos de escarificação permitiram que os reguladores de crescimento (especialmente TU $10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$, CEPA $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, BA $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ e CEPA + BA $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) atingissem o embrião, que foi, assim, capaz de crescer e romper a barreira tegumentar.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins SW, Bellairs SM, Loch DS (2002) Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. **Euphytica** 126: 13–20

Agbo GN, Powell AA, Matthews S (1991) Association of differences in seed vigour in long bean (*Vigna sesquipedalis*) with testa colour and imbibition damage. **Journal of Agricultural Science** 116: 159-164

Alves E (2004) **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. UFLA, Lavras. 51 p

Alves EU, Bruno RLA, Oliveira AP, Alves AU, Alves AU (2006) Ácido sulfúrico na superação da dormência de unidades de dispersão de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.). **Árvore** 30: 187-195

Amri E (2010) The effects of pre-sowing seed treatments on germination of snake bean (*Swartzia madagascariensis*) a reported medicinal plant. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences** 6: 557-561

Araujo EF, Araujo CF, Araujo RF, Galvão JCC, Silva RF (1996) Efeito da escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. na germinação. **Revista Brasileira de Sementes** 18: 73-76

Araújo EF, Araújo, RF, Silva RF, Gomes JM (2000) Avaliação de diferentes métodos de escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes viscosa* SW. **Revista Brasileira de Sementes** 22: 18-22

Argel PJ, Humphreys LR (1983 a) Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano I. Temperature. **Australian Journal of Agricultural Research** 34: 261-270

Argel PJ, Humphreys LR (1983 b) Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano II. Moisture supply and illuminance. **Australian Journal of Agricultural Research** 34: 271-277

Argel PJ, Humphreys LR (1983 c) Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano III. Storage humidity and seed characteristics. **Australian Journal of Agricultural Research** 34: 279-287

Arteca RN (1996) **Plant growth substances: principles and applications**. Chapman and Hall, Nova York. 352 p

Babiker AGT, Butler LG, Ejeta G, Woodson WR (1993) Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinins and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds. **Plant Physiology** 89: 21-26

Baskin CC, Baskin JM (1998) Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego. 666 p

Baskin JM, Baskin CC, Li X (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. **Plant Species Biology** 15: 139–152

Bewley JD, Black M (1994) Physiology of development and germination. Second Ed. Plenum Press, New York. 445 p

Bhatt RK, Tripathi RK, Tiwari HS, Rajput DS, Chandra A (2008) Effect of dormancy breaking treatments on seed germination of *Stylosanthes* species. **Indian Journal of Plant Physiology** 13: 60–65

Blom CWPM, Voesenek LACJ (1996) Flooding: the survival strategies of plants. **Tree** 11: 290-295

Brasil (2009) Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, DF: Mapa/ACS, Brasília. 399 p

Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos** 6: 255

Burin M, Barros RS, Rena AB (1987) Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. **Turrialba** 37: 281-285

Cameron DF (1967) Hardseededness and seed dormancy of Townsville Lucerne (*Stylosanthes humilis*) selections. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry** 7: 237-240

Cameron DF, 't Mannetje L (1977) Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry** 17: 417-424

Carmona R, Ferguson JE, Maia MS (1986) Germinação de sementes em *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr et Souza Costa e *S. capitata* Vog. in Linnaea. **Revista Brasileira de Sementes** 8: 19-27

Cavanagh AK (1983) The anatomy and morphology of *Acacia* seeds in relation to germination. **Bulletin of the International Group for the Study of Mimosideae** 11: 58-62

Charrière-Ladreix Y (1976) Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta** 129: 167-174

Cocucci AE, Mariath JEA (2004) Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. In Ferreira AG e Borghetti F (eds) **Germinação: do básico ao aplicado.** Artmed, Porto Alegre, pp 15-30

Cook BG, Pengelly BC, Brown SD, Donnelly JL, Eagles DA, Franco MA, Hanson J, Mullen BF, Partridge IJ, Peters M, Schultze-Kraft R (2005) Tropical forages: an interactive selection tool. [CD-ROM], CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia. Disponível em <www.tropicalforages.info> Acesso em: 22 de junho de 2011

Debeaujon I, Lepiniec L, Pourcel L, Routaboul J (2007) Seed coat development and dormancy, *In* Bradford e Nonogaki (eds) **Seed development, dormancy and germination**. Blackwell, Oxford, pp 25-49

De Castro RD, Bradford KJ, Hilhorst HWM (2004) Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In* Ferreira AG e Borghetti F (eds) **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, pp 51-68

Delatorre CA, Barros RS (1996) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as related to heavy metal ions. **Biologia Plantarum** 38: 269-274

De Souza FHD, Marcos-Filho J (2001) The seed coat as a modulador of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica** 24: 365-375

Devide MD, Duke SO, Fedtke C (1993) **Physiology of herbicide action**. Prentice Hall International, Londres. 441 p

Edye LA, Cameron DG (1984) Prospects for *Stylosanthes* improvement and utilization. *In* Stace HM, Edye LA (eds) **The biology and agronomy of Stylosanthes**. Academic Press, Sydney, pp 571-587

Figueiredo FJC, Popinigis F (1979) Superação da dormência de sementes de malva. **Revista Brasileira de Sementes** 1: 1-14

Footitt S, Cohn MA (1992) Seed dormancy in red rice VIII. Embryo acidification during dormancy-breaking and subsequent germination. **Plant Physiology** 100: 1196-1202

Gillikin J, Graham JS (1991) Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. **Plant Physiology** 96: 214-220

Hamley DH (1932) Softening of the seeds of *Melilotus alba*. **Botanical Gazette** 93: 345-375

Hutton ME, Porter RH (1937) Seed impermeability and viability of native and introduced species of Leguminosae. **Iowa State Journal of Science** 12: 5-24

Hyde EOC (1954) The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. **Annals of Botany** 18: 241-256

Khan AA, Huang XL (1988) Synergistic enhancement of ethylene production and germination with kinetin and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in lettuce seeds exposed to salinity stress. **Plant Physiology** 87: 847-852

- Johansen DA** (1940) **Plant microtechnique**. MacGraw – Hill, New York. 790 p
- Klusmann C** (1988) Trees and shrubs for animal production in tropical and subtropical areas. **Plant Research and Development** 27: 92-104
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL** (1987) Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **HortScience** 22: 371-377
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M** (2005) **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom. 577 p
- Logan DC, Stewart GR** (1991) Role of ethylene in the germination of the hemiparasite *Striga hermonthica*. **Plant Physiology** 97: 1435–1438
- Logan DC, Stewart GR** (1995) Thidiazuron stimulates germination and ethylene production in *Striga hermonthica* – comparison with the effects of GR-24, ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Seed Science Research** 5: 99–108
- Marcos-Filho J** (2005) **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Fealq, Piracicaba. 495 p
- Mohamed-Yasseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE, Constanza S** (1994) The role of seeds coat in seed viability. **Botanical Review** 60: 426-439
- Mott JJ, McKeon GM** (1979) Effect of heat treatments in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. **Seed Science and Technology** 7: 15-25
- Mundim RC, Salomão AN** (1999) Tratamentos pré-germinativos para superação da dormência de sementes de escova-de-macaco (*Apeiba tibourbau* Aubl.-Tiliaceae). **Informativo ABRATES** 9: 81
- Nan ZB, Hanson J, Yeski WM** (1998) Effects of sulfuric acid and hot water treatments and soilborne fungi on germination of *Stylosanthes hamata*, *S. guianensis* and *S. scabra*. **Seed Science and Technology** 26: 33-43
- Nikoleave MG** (1977) **Factors controlling seed dormancy pattern**. North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp 51-74
- Pelacani CR, Barros RS, Ribeiro DM, Frigeri RBC** (2005). Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with low pH solutions. **Acta Physiologiae Plantarum** 27: 387-393
- Pinheiro FJA, Barros RS, Coelho TG, Souza BML** (2008) Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with selenium compounds. **Seed Science Research** 18: 47–53

Rao VS, Sankhla N, Khan AA (1975) Additive and synergistic effects of kinetin and ethrel on germination, thermodormancy and polyribosome formation in lettuce seeds. **Plant Physiology** 56: 263-266

Ribeiro DM, Barros RS (2004) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as promoted by ethylene accumulation in closed environments. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 16: 83-88

Rolston MP (1978) Water impermeable seed dormancy. **Botanical Review** 44: 365-396

Santos MO, Karia CT, Resende RMS, Chiari L, Jungmann L, Zucchi MI, Souza AP (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Conservation Genetics Resources** 1: 43-46

Serrato-Valenti G, Cornara L, Ferrando M, Modenesi P (1993). Structural and histochemical features of *Stylosanthes scabra* (Leguminosae; Papilionoideae) seed coat as related to water entry. **Canadian Journal of Botany** 71: 834-840

Scott AJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30: 507-512

Tao KL, McDonald MB, Kran AA (1974) Synergistic and additive effects of kinetin and Ethrel in the release of seed dormancy. **Life Sciences** 15: 1925-1933

Tweddle JC, Baskin CC, Baskin JM (2003) Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology** 91: 294-304

Tran VN, Cavanagh AK (1984). Structural aspects of dormancy. *In* Murray DR (ed) **Seed Physiology**, vol. 2. Academic Press, Sydney, pp 1-43

Vazquez-Yanes C, Orozco-Segovia A (1993) Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics** 24: 69-87

Vieira HD, Barros RS (1994) Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. **Physiologia Plantarum** 92: 17-20

Zeng LW, Cocks PS, Kailis SG, Kuo J (2005) The role of fractures and lipids in the seed coat in the loss of hardseededness of six Mediterranean legume species. **Journal of Agricultural Science** 143: 43-55